

31



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12P 13/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/18228  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210  (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98)  (30) Prioritätsdaten: 197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE 198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PE- TERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).  (74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD

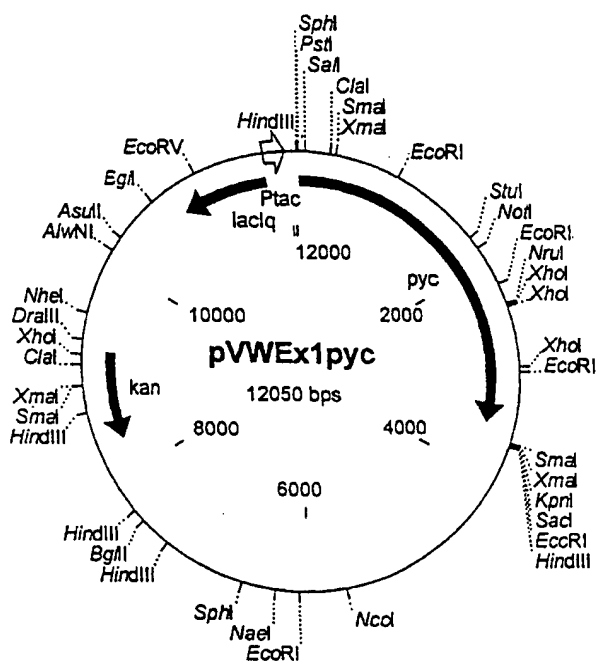
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL

(57) Abstract

The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.



# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TC	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland						
DK	Dänemark						
EE	Estland						

## Beschreibung

5

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie und im Verfahren einsetzbare Mittel

---

10

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie gemäß den Ansprüchen 1 bis 17, Pyruvat-Carboxylase-Gene nach Anspruch 18 bis 23, Genstrukturen nach Anspruch 24, Vektoren nach Anspruch 25, transformierte Zellen nach Anspruch 26 bis 31 sowie

15 Verwendungen nach Anspruch 32 bis 37.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z.B. L-Lysin wie auch L-Threonin, L-Methionin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-

20 Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament oder L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die

25 biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z.B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten *ssp. flavum* und *ssp. lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol 1991, 41: 255 bis 260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

30

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschalten der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z.B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist beispielsweise ein Verfahren beschrieben, bei dem Corynebacterium-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Theoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849, GB 2 152 509).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z.B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmid-kodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 123475/1986, EP 0 488 424).

Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese kodieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z.B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese

der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte  
Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Isoleucinbildung erreicht (EP 0  
5 436 886).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine  
verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels.  
So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der  
10 Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin oder L-  
Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463). Weiterhin führt die Reduktion der  
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu verbesserter  
Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 333 145), wohingegen die Erhöhung der  
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität in Corynebacterium zu erhöhter  
15 Ausscheidung von Aminosäuren der Aspartatfamilie führte (EP 0 358 940).

Während des Wachstums und speziell unter Aminosäureproduktionsbedingungen muß  
der Tricarbonsäure-Cyclus kontinuierlich und effektiv mit C4-Verbindungen, z.B.  
Oxalacetat, aufgefüllt werden, um die für die Aminosäurebiosynthese abgezogenen  
20 Zwischenprodukte zu ersetzen. Bis vor kurzem hat man angenommen, daß für diese  
sogenannten anaplerotischen Funktionen in Corynebacterium die  
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase verantwortlich ist (Kinoshita, Biology of industrial  
micro-organisms 1985: 115 bis 142, Benjamin/Cummings Publishing Company,  
London; Liebl, The prokaryotes II, 1991: 1157 bis 1171, Springer Verlag N.Y.;  
25 Vallino und Stephanopoulos, Biotechnol Bioeng 1993, 41: 633 bis 646). Es wurde  
jedoch gefunden, daß Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-negative Mutanten im  
Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsstämmen auf allen getesteten Medien gleich  
wuchsen (Peters-Wendisch et al., FEMS Microbiology Letters 1993, 112: 269 bis  
274; Gubler et al., Appl Microbiol Biotechnol 1994, 40: 857 bis 863). Dieses

Ergebnis zeigte, daß die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nicht essentiell für das Wachstum ist und für die anaplerotischen Reaktionen keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Desweiteren wies das oben genannte Ergebnis darauf hin, daß es in *Corynebacterium* mindestens ein anderes Enzym geben muß, das für die Synthese von Oxalacetat, das für das Wachstum benötigt wird, verantwortlich ist. Kürzlich wurde auch tatsächlich eine Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *Corynebacterium glutamicum* gefunden (Peters-Wendisch et al., Microbiology 1997, 143: 1095 bis 1103). Dieses Enzym wird effektiv durch AMP, ADP und Acetyl-Coenzym A inhibiert und in Gegenwart von Laktat als Kohlenstoffquelle in erhöhter Menge gebildet. Da davon ausgegangen werden mußte, daß dieses Enzym in erster Linie für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Cycluses beim Wachstum verantwortlich ist, war zu erwarten, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität entweder zu keiner oder allenfalls zu einer geringfügigen Erhöhung der zur Aspartatfamilie gehörenden Aminosäuren führt. Desweiteren wurde erwartet, daß eine Erhöhung der Genexpression bzw. der Enzymaktivität der Pyruvat-Carboxylase ebenso keinen Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren anderer Familien haben würde.

20

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und / oder nach Erhöhung der Pyruvat-Carboxylase-Genexpression die mikrobielle Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder der Glutamatfamilie erhöht wird. Es zeigte sich, daß insbesondere Stämme mit erhöhter Kopienzahl des Pyruvat-Carboxylase-Gens etwa 50% mehr Lysin, 40% mehr Threonin und 150% mehr Homoserin ins Kulturmedium ausscheiden. Es zeigte sich weiterhin, daß überraschenderweise auch die Glutamatproduktion signifikant erhöht ist (vgl. insbesondere Ausführungsbeispiel unter 6. und Tabelle 4).

30

- Die genetische Veränderung der Pyruvat-Carboxylase zur Erhöhung der Enzymaktivität erfolgt vorzugsweise durch Mutation des endogenen Gens. Derartige
- 5 Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder durch mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e).
- 10 Die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Expression des Gens positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß
- 15 durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordneten Regulatorgens erfolgen. Desweiteren kann ggf durch Mutation
- 20 einer regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung eines Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Pyruvat-Carboxylase-Gens so beeinflußt sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Pyruvat-Carboxylase-Gen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. „enhancer“ zugeordnet sein, die über eine verbesserte
- 25 Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Pyruvat-Carboxylase-Genexpression bewirken. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein Genkonstrukt bzw. Vektor eingebaut. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Pyruvat-Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Sequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Für den Einbau des Pyruvat-Carboxylase-Gens in ein Genkonstrukt wird das Gen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert und in einen Aminosäureproduzierenden Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium* oder in *Escherichia coli* oder *Serratia marcescens*, transformiert. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* oder *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*. Nach Isolierung des Gens und der in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (vgl. z.B. Simon et al., *Bio/Technology* 1983, 1: 784 bis 791; Eikmanns et al., *Gene* 1991, 102: 93 bis 98) erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al., *FEMS Microbiology Letters* 1991, 65: 299 bis 304) oder Konjugation (Schäfer et al., *J Bacteriol* 1990, 172: 1663 bis 1666). Als Wirtsstämme werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäure dereguliert sind und/oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die entsprechende Aminosäure aufweisen. Weiterhin werden solche Stämme bevorzugt, die einen erhöhten Anteil an solchen Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligt sind und / oder Stämme, die einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten, insbesondere an Metaboliten, die für Konkurrenzreaktionen zuständig sind; d.h. es werden solche Stämme bevorzugt, bei denen ein zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyntheseweg mit verminderter Aktivität abläuft. So ist insbesondere ein, gegen L-Asparaginsäure- $\beta$ -Methylester (AME) resistenter coryneformer Mikroorganismen-Stamm mit reduzierter Citrat-Synthase-Aktivität geeignet (EP 0 551 614).



Nach Isolierung sind Pyruvat-Carboxylase-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die unter SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren  
5 Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweisen. Desweiteren sind Gene mit einem vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109 gemäß SEQ ID No. 1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz erhältlich. Allelvariationen bzw.  
10 gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei die Enzymaktivität bzw. -funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. Diese Pyruvat-Carboxylase-Gene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

15

Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

20 Dem Pyruvat-Carboxylase-Gen ist vorzugsweise der tac-Promotor ( $\text{lacI}^Q$ -Gen) vorgeschaltet, wobei diesem insbesondere regulatorische Sequenzen zugeordnet sind.

Durch Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens sind Plasmide erhältlich, die das Gen enthalten und zur Transformation eines Aminosäureproduzenten geeignet sind.

25 Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid oder Vektor.

### Ausführungsbeispiel

#### 5 1. Klonierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bisher bekannten Pyruvat-Carboxylase-(pyc-)Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol Gen Genet 1991, 229: 307-315), Mensch (Biochim Biophys Acta 1994, 1227: 46-52), Maus (Proc Natl Acad Sci, USA 1993, 90: 1766-1770), *Aedes aegypti* (EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530) sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech). Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des pyc-Gens von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte mittels PCR nach der Standardmethode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) für nicht-degenerierte, homologe Primer ein Fragment von ca. 200 bp aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032, die wie bei Eikmanns et al. (Microbiology 1994, 140: 1817-1828) beschrieben, isoliert wurde, amplifiziert werden. Die Größe von 200 bp entsprach der Erwartung für pyc-Gene. Das PCR-Produkt wurde wie bei Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) beschrieben, sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

25

Ausgehend von diesem DNA-Fragment aus *C. glutamicum* wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc 1	5'-	CGTCTTCATCGAAATGAAC -3'
pyc 2	5'-	ACGGTGGTGATCCGGCACT -3'

30

Die Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (pyc) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in  
5 eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigenin-markierten Nukleotiden eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des 'PCR DIG Labeling Kits' der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entsprach. Die so hergestellte pyc-Sonde wurde  
10 dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das pyc-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurden jeweils 2 bis 5 µg chromosomaler DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen HindIII, SphI, Sall, DraI, EcoRI und BamHI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen  
15 Agarosegel gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) denaturiert und vakuumunterstützt mit der VacuGene Blot Apparatur von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) aus der Gelmatrix auf eine Nylon-Membran (Nytran N13 von Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz)  
20 transferiert, immobilisiert und die Digoxigeninmarkierung mittels NBT/X-Phosphat-Umsetzung durch alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf diese Weise konnten folgende, mit der pyc-DNA-Sonde hybridisierende chromosomale Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb HindIII-Fragment, ein 6,5 kb Sall-Fragment und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment.

25

Das 17 kb HindIII-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pH79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99% repräsentierte (Mol Microbiol 1992, 6: 317-326). Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde mit dieser Genbank mittels der

30

CaCl<sub>2</sub>-Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert und zu ca. 300 Kolonien pro

5 LB-Agarplatte mit 50 µg/l Kanamycin ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten auf Nytran N13-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min. inkubiert. Die darauffolgende Neutralisierung erfolgte mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl.

10 Nach Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen pyc-Sonde, wie bei Southern (J Mol Biol 1975, 98: 503-517) beschrieben, verwendet. Es wurden 3

15 Transformanten identifiziert, die gegen die pyc-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA mittels Plasmid-Präparation nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim (Meth Enzymol 1983, 100: 243-255) isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des HindIII-Fragments getestet. Das Cosmid pHC79-10, das ein 40 kb

20 Insert enthielt, trug das 17 kb HindIII-Fragment vollständig und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen SalI und EcoRI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 6,5 kb SalI- und ein 1,35 kb EcoRI-Fragment, erhalten wurden. Das 17 kb HindIII-Fragment wurde durch Restriktion mit HindIII aus dem Cosmid isoliert und in den E.

25 coli-Vektor pUC18, der ebenfalls mit HindIII geschnitten wurde, ligiert. Es wurde eine Restriktionsanalyse des Fragments in dem resultierenden Vektor pUCpyc erstellt. Die physikalische Kartierung des Fragments ist in Figur 1 dargestellt.

## 2. Sequenzierung des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 In weiteren Subklonierungsschritten wurden ein 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment, das 1,35 kb EcoRI-Fragment, ein 1,6 kb EcoRI-EcoRI-StuI-Fragment sowie ein 1,6 kb ClaI-Fragment, das partiell mit dem 0,85 kb SalI-EcoRI-Fragment überlappte, durch Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid pUCpyc isoliert. Durch Ligation wurden die Fragmente in den jeweils entsprechend  
10 restringierten Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1977, 74: 5463-5467) wie oben beschrieben sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Sequenzanalyse der Fragmente ergab ein durchgehendes offenes Leseraster von 3576  
15 bp, das für eine Proteinsequenz von 1140 Aminosäuren kodiert. Ein Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz mit der EMBL Gen-Datenbank (Heidelberg) ergab Ähnlichkeiten zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen. Die höchste Identität (62%) wurde zur putativen Pyruvat-Carboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-GenBank: Accession Nr. U00024) gefunden. Die Ähnlichkeit betrug, unter  
20 Berücksichtigung konservierter Aminosäureaustausche, 76%. Ein Vergleich mit den Pyruvat-Carboxylasen anderer Organismen ergab 46 bis 47% identische und 64 bis 65% ähnliche Aminosäuren (Gene 1997, 191: 47-50; J Bacteriol 1996, 178: 5960-5970; Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 1766-1770; Biochem J 1996, 316: 631-637; EMBL-GenBank: Accession Nr. L36530; J Biol Chem 1988, 263: 11493-11497; Mol  
25 Gen Genet 1991, 229: 307-315). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß das klonierte Fragment das Gen für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* trägt. Die Nukleotidsequenz des Gens ist unter SEQ ID No.1 und die entsprechende Aminosäuresequenz unter SEQ ID No. 2 angegeben.

### 3. Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens

5 Zur Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* wurde das Gen aus dem Plasmid pUCpyc als 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment in den *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pEK0 (Gene 1991, 102: 93-98) kloniert, der mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PstI geschnitten wurde. Mittels Klenow-Polymerase-Behandlung wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden  
10 aufgefüllt (EcoRI) bzw. abgedaut (PstI), und der linearisierte Vektor wurde mit dem 6,2 kb SspI-ScaI-Fragment ligiert. Das erhaltene Konstrukt pEK0pyc wurde zunächst in den Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, die Plasmid-DNA auf den erhaltenen Transformanten isoliert und auf die Richtigkeit des Inserts durch Restriktion kontrolliert. Die DNA wurde anschließend in den Stamm SP733 durch  
15 Elektroporation eingebracht (FEMS Microbiol Lett 1989, 65: 299-304). Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Mutante des restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stammes R127 (Dechema Biotechnology Conference 1990, 4: 323-327, Verlag Chemie), die durch chemische Mutagenese erhalten worden war und sich dadurch auszeichnet, daß sie nicht auf Minimalmedium mit Pyruvat und Lactat als einziger  
20 Kohlenstoffquelle wachsen kann (Microbiology 1997, 143: 1095-1103). Dieser Phänotyp wird durch einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase hervorgerufen und konnte durch das Einbringen des Pyruvat-Carboxylase-Gens aus *C. glutamicum* komplementiert werden, d.h. der Stamm, der das Plasmid pEK0pyc trägt, war im Gegensatz zum Ausgangsstamm wieder in der Lage auf Minimalmedium mit Lactat  
25 als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Damit war auch der Beweis erbracht, daß das Gen für eine funktionelle Pyruvat-Carboxylase kodiert.

Darüber hinaus wurde das Plasmid pEK0pyc in den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert. Der resultierende Stamm WT (pEK0pyc)

wurde im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032 bezüglich seiner Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. Die Stämme wurden in Komplexmedium (Luria-Bertani, Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit 0,5 % Lactat und auf Minimalmedium mit 2 % Lactat bzw. 4 % Glukose gezüchtet, und der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde entsprechend der Methode, wie sie bei Peters-Wendisch et al. (Microbiology 1997, 143: 1095-1103) beschrieben wurde, durchgeführt. Das Ergebnis der Analyse (Tabelle 1) zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im pEK0-pyc-tragenden Stamm ca. 4-fach höher als im Ausgangsstamm war.

#### 4. Gesteigerte Akkumulation von Lysin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DG52-5

Zur Untersuchung der Auswirkung der Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase in dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 (J Gen Microbiol 1988, 134: 3221-3229) wurde der Expressionsvektor pVWEX1 verwendet, der eine IPTG-induzierbare Expression erlaubt. In diesen Vektor wurde das pyc Gen promotorlos hinein kloniert. Dazu wurden zunächst PCR-Primer (Primer 1 = Position 112 - 133; Primer 2 = Position 373 bis 355 in der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1) synthetisiert und 261 bp des promotorlosen Anfangsbereichs des Pyruvat-Carboxylase-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß Primer 1 eine PstI-Schnittstelle vermittelt und Primer 2 eine BamHI-Schnittstelle. Nach der PCR wurde das erhaltene 274 bp PCR-Produkt isoliert, zu Konkaternen ligiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen PstI und BamHI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde durch Ethanol-Fällung ankonzentriert und anschließend mit dem PstI-BamHI-geschnittenen Vektor pVWEX1 ligiert. Das erhaltene Konstrukt

pVWEX1-PCR wurde durch Restriktion getestet. Der Endbereich des pyc Gens wurde durch RcaI-Klenow-SalI-Behandlung aus dem Vektor pEK0pyc isoliert und in den BamHI-Klenow-SalI behandelten Vektor pVWEX1-PCR ligiert. Das erhaltene Konstrukt pVWEX1pyc wurde durch Restriktionskartierung analysiert. Eine physikalische Karte des Plasmids ist in Figur 2 gezeigt.

Das Plasmid wurde durch Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm DG52-5 eingebracht. Als Kontrolle wurde der Stamm DG52-5 mit dem Vektor pVWEX1 ohne Insert transformiert und die L-Lysinausscheidung jeweils drei verschiedener Transformanten verglichen. Dazu wurden DG52-5(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DG52-5(pVWEX1pyc)3, 4 und 6 in Komplexmedium (2xTY; Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press; mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden jeweils zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Lysinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 2 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer um 50 % gesteigerten Akkumulation von Lysin im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.



## 5. Gesteigerte Akkumulation von Threonin und Homoserin durch Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens im Stamm *C. glutamicum* DM368-3

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-Bildung wurde auch die Akkumulation von Threonin im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Threoninproduktionsstamm *C. glutamicum* DM368-3 (Degussa AG) mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Threoninausscheidung von jeweils drei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurden DM368-3(pVWEX1)1, 2 und 3 sowie DM368-3(pVWEX1pyc)1, 2 und 3 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Threoninmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 3 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils drei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer ca. 40%igen Steigerung der Threoninkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Threoninbildung entscheidend zu verbessern.

Desweiteren zeigte die Aminosäurekonzentrationsbestimmung, daß überraschenderweise der Stamm mit überexprimiertem Pyruvat-Carboxylase-Gen außerdem etwa 150% mehr Homoserin ins Medium ausschied als der Stamm mit nicht überexprimiertem Gen. Die entsprechenden Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3 dargestellt. Sie machen deutlich, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren sowohl die Threonin- als auch die Homoserinbildung entscheidend verbessert werden kann.

6. Gesteigerte Akkumulation von Glutamat durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase im Wildtyp von *C. glutamicum*

Analog zu den Experimenten zur L-Lysin-, L-Threonin- und L-Homoserin-Bildung (siehe oben unter 4. und 5.) wurde auch die Akkumulation von Glutamat im Kulturüberstand durch Überexpression des Gens für die Pyruvat-Carboxylase untersucht. Hierzu wurde, wie unter Punkt 4 beschrieben, der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 mit dem Plasmid pVWEX1pyc sowie zur Kontrolle mit dem Plasmid pVWEX1 transformiert und die Glutamatausscheidung von jeweils zwei verschiedenen Transformanten untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) D1 und D2 sowie *C. glutamicum* ATCC 13032 (pVWEX1pyc) 1 und 2 in Komplexmedium (2xTY mit 50 µg/l Kanamycin) gezüchtet und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol 1993, 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich Kanamycin, um die Plasmide stabil zu halten. Zur Induktion der Glutamatausscheidung wurde dem Medium ca. 6 Stunden nach dem Inokulieren 25 mg Tween 60 pro ml zugesetzt. Es wurden zwei parallele Ansätze durchgeführt, wobei einem Kolben 200 µg IPTG/ml zugesetzt wurde, während der zweite Kolben kein IPTG enthielt. Nach Kultivierung für 48 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte Glutamatmenge bestimmt. Die Bestimmung der

Aminosäurekonzentration erfolgte ebenfalls mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (J Chromat 1983, 266: 471-482). Das Ergebnis der  
5 Fermentation ist in Tabelle 4 dargestellt, wobei die angegebenen Werte Mittelwerte aus jeweils zwei Experimenten mit unterschiedlichen Klonen darstellen. Es zeigte sich, daß die Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens zu einer bis zu 500%igen Steigerung der Glutamatkonzentration im Medium führt. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Gens für das anaplerotische Enzym Pyruvat-  
10 Carboxylase ein Verfahren dar, um die L-Glutamatbildung entscheidend zu verbessern.

Stamm	IPTG [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Pyruvat-Carboxylase [ $\text{nmol min}^{-1} \text{mg Trockengewicht}^{-1}$ ]
13032(pEK0pyc)	0	$75 \pm 13$
ATCC 13032	0	$19 \pm 4$
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	$88 \pm 13$
	0	$11 \pm 2$
DG52-5(pVWEX1)	200	$5 \pm 2$
	0	$6 \pm 1$
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	$76 \pm 10$
	0	$12 \pm 3$
DM368-3(pVWEX1)	200	$10 \pm 1$
	0	$11 \pm 2$

Tabelle 1

Stamm	IPTG [µg/ml]	Lysin [mM]
DG52-5(pVWEX1pyc)	200	35,4 ± 2,6
	0	23,6 ± 2,9
DG52-5(pVWEX1)	200	23,3 ± 2,9
	0	22,1 ± 4,0

**Tabelle 2**

Stamm	IPTG [µg/ml]	Threonin [mM]	Homoserin [mM]
DM368-3(pVWEX1pyc)	200	10,2 ± 0,5	14,4 ± 1,2
	0	7,9 ± 1,0	5,6 ± 0,2
DM368-3(pVWEX1)	200	8,0 ± 0,5	5,8 ± 0,7
	0	7,5 ± 0,8	6,1 ± 1,0

**Tabelle 3**

Stamm	IPTG [µg/ml]	Glutamat [mM]
ATCC 13032	200	11 ± 2
ATCC 13032	0	13 ± 2
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	200	67 ± 4
ATCC 13032(pVWEX1-pyc)	0	32 ± 4

Tabelle 4

5      Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat-  
und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch  
10      genetische Veränderung des Enzyms und / oder die Pyruvat-Carboxylase-  
Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden  
Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1,  
15      dadurch gekennzeichnet,  
daß durch Mutation des endogenen Pyruvat-Carboxylase-Gens ein Enzym  
mit höherer Pyruvat-Carboxylase-Aktivität erzeugt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,  
20      dadurch gekennzeichnet,  
daß die Genexpression der Pyruvat-Carboxylase durch Erhöhen der  
Genkopienzahl erhöht wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,  
25      dadurch gekennzeichnet,  
daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Pyruvat-Carboxylase-Gen in ein  
Genkonstrukt eingebaut wird.



5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß das Gen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Pyruvat-  
Carboxylase-Gen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus  
mit dem das Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
15 daß ein Mikroorganismus der Gattung Corynebacterium mit dem das Gen  
enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die  
an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme  
dereguliert sind und / oder die eine erhöhte Exportcarrier-Aktivität für die  
entsprechende Aminosäure aufweisen.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen  
erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden Aminosäure  
beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, bei dem ein  
zu dem entsprechenden Aminosäurebiosyntheseweg konkurrierender Biosyn-  
theseweg mit verminderter Aktivität abläuft.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
10 dadurch gekennzeichnet,  
daß das Pyruvat-Carboxylase-Gen aus einem Mikroorganismus-Stamm der  
Gattung Corynebacterium isoliert wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
15 dadurch gekennzeichnet,  
daß die Genexpression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht  
wird.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
20 dadurch gekennzeichnet,  
daß dem Pyruvat-Carboxylase-Gen der tac-Promotor vorgeschaltet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13,  
gekennzeichnet durch  
25 dem tac-Promotor zugeordnete regulatorische Sequenzen.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit einer für die unter SEQ ID  
30 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen

kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird.

- 5      16. Verfahren nach Anspruch 15,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         daß als Pyruvat-Carboxylase-Gen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von  
         Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen  
         gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
- 10      17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von  
         Lysin, Threonin, Homoserin, Glutamat und/oder Arginin.
- 15      18. Pyruvat-Carboxylase-Gen mit einer für die unter SEQ ID No. 2  
         angegebenen Aminosäuresequenz und / oder deren Allelvariationen  
         kodierenden Nukleotidsequenz.
- 20      19. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 mit der Nukleotidsequenz von  
         Nukleotid 165 bis 3587 gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer im wesentlichen  
         gleichwirkenden DNA-Sequenz.
- 25      20. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit einem  
         vorgeschalteten Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 20 bis 109  
         gemäß SEQ ID No. 1 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-  
         Sequenz.
- 30      21. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 18 oder 19 mit vorgeschaltetem  
         tac-Promotor

22. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach Anspruch 21 mit dem Promotor  
zugeordneten regulatorischen Sequenzen.
- 5 23. Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 20 mit diesem  
zugeordnete regulatorische Gensequenzen.
24. Genstruktur, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der  
10 Ansprüche 18 bis 23.
25. Vektor, enthaltend ein Pyruvat-Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche  
18 bis 23 oder eine Genstruktur nach Anspruch 24.
- 15 26. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Pyruvat-  
Carboxylase-Gen nach einem der Ansprüche 18 bis 23 oder eine Genstruktur  
nach Anspruch 24.
27. Transformierte Zelle nach Anspruch 26, enthaltend einen Vektor nach  
20 Anspruch 25.
28. Transformierte Zelle nach Anspruch 26 oder 27,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
- 25 29. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß in dieser die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten  
Enzyme und / oder die am Export der entsprechenden Aminosäure  
30 beteiligten Enzyme dereguliert sind.

30. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 daß sie einen erhöhten Anteil an den an der Synthese der entsprechenden  
Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
31. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 26 bis 30,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 daß sie einen erniedrigten Anteil an den nicht an der Synthese der  
entsprechenden Aminosäure beteiligten Zentralstoffwechselmetaboliten  
enthält.
32. Verwendung eines Pyruvat-Carboxylase-Gens zur Steigerung der  
15 Produktion von aus der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie stammenden  
Aminosäuren von Mikroorganismen.
33. Verwendung nach Anspruch 32,  
dadurch gekennzeichnet,  
20 daß ein mutiertes Pyruvat-Carboxylase-Gen, das für ein Enzym mit erhöhter  
Pyruvat-Carboxylase-Aktivität kodiert, verwendet wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,  
dadurch gekennzeichnet,  
25 daß der die entsprechende Aminosäure produzierende Mikroorganismus mit  
einem Genkonstrukt, das ein Pyruvat-Carboxylase-Gen enthält, transformiert  
wird.

35. Verwendung nach Anspruch 34,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen enthält.

36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 35,

dadurch gekennzeichnet,

10 daß ein Pyruvat-Carboxylase-Gen aus *Corynebacterium* verwendet wird.

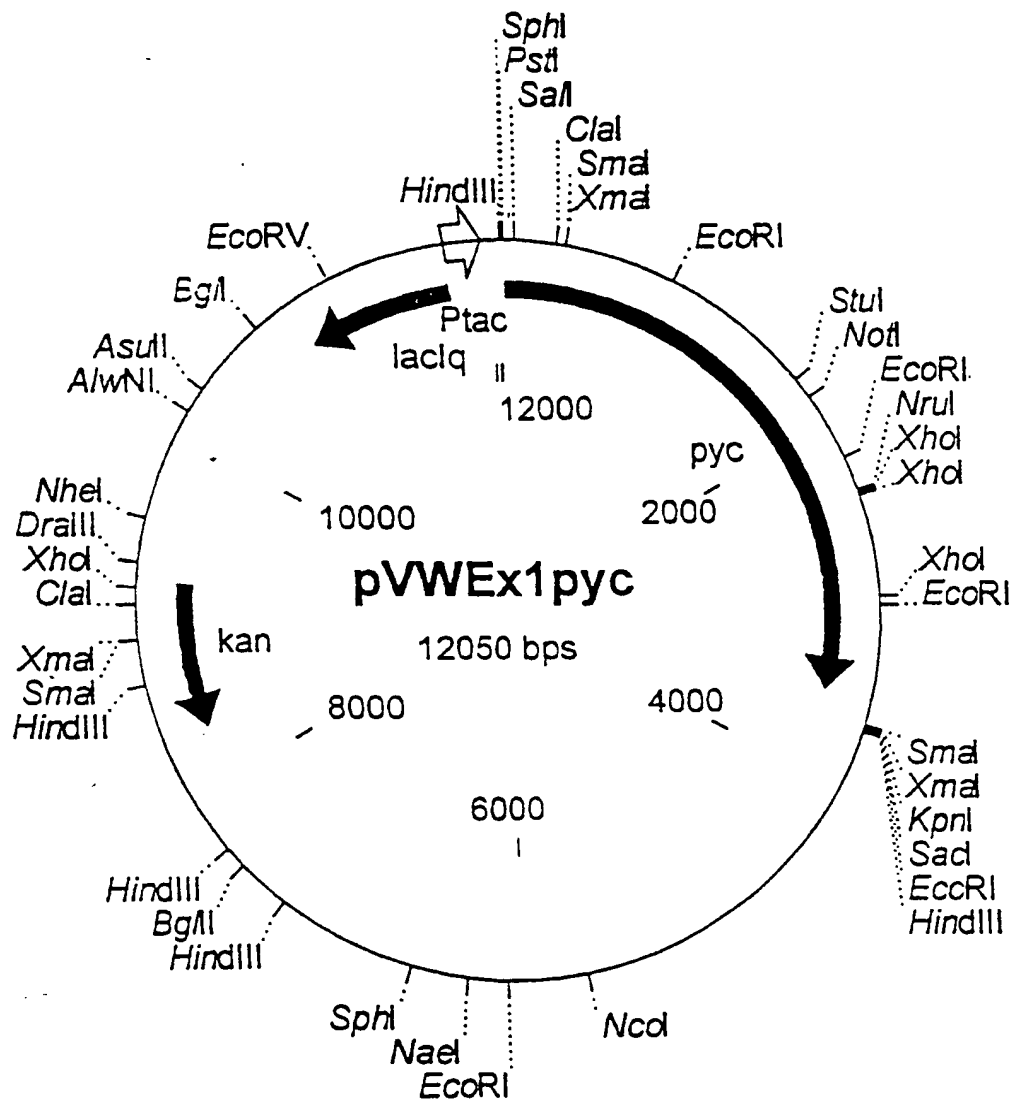
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32 bis 36,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus *Corynebacterium* verwendet wird.



2/2



Figur 2



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Postfach 1913
- (C) ORT: Juelich
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pyruvat Carboxylase

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3728 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCAACCGTG CTTGAAGTCG TGCAGGTCAG GGGAGTGTTG CCCGAAAACA TTGAGAGGAA	60
AACAAAAACC GATGTTTGAT TGGGGGAATC GGGGGTTACG ATACTAGGAC GCAGTGACTG	120
CTATCACCTT TGGCGGTCTC TTGTTGAAAG GAATAATTAC TCTAGTGTCTG ACTCACACAT	180
CTTCAACGCT TCCAGCATTC AAAAAGATCT TGGTAGCAAA CCGCGGCGAA ATCGCGGTCC	240
GTGCTTTCCG TGCAGCACTC GAAACCGGTG CAGCCACGGT AGCTATTTAC CCCCCTGAAG	300
ATCGGGGATC ATTCCACCGC TCTTTTGCTT CTGAAGCTGT CCGCATTGGT ACCGAAGGCT	360
CACCACTCAA GCGGTACCTG GACATCGATG AAATTATCGG TGCAGCTAAA AAAGTTAAAG	420
CAGATGCCAT TTACCCGGGA TACGGCTTCC TGTCTGAAAA TGCCCAGCTT GCCCGCGAGT	480

GTGCGGAAAA CGGCATTACT TTTATTGGCC CAACCCCAAGA GGTTCCTTGAT CTCACCGGTG 540  
ATAAGTCTCG CGCGGTAACC GCCGCGAAGA AGGCTGGTCT GCCAGTTTTG GCGGAATCCA 600  
CCCCGAGCAA AAACATCGAT GAGATCGTTA AAAGCGCTGA AGGCCAGACT TACCCCATCT 660  
TTGTGAAGGC AGTTGCCGGT GGTGGCGGAC GCGGTATGCG TTTTGTGCT TCACCTGATG 720  
AGCTTCGCAA ATTAGCAACA GAAGCATCTC GTGAAGCTGA AGCGGCTTTC GGCGATGGCG 780  
CGGTATATGT CGAACGTGCT GTGATTAACC CTCAGCATAT TGAAGTGCAG ATCCTTGGCG 840  
ATCACACTGG AGAAGTTGTA CACCTTTATG AACGTGACTG CTCACTGCAG CGTCGTCACC 900  
AAAAAGTTGT CGAAATTGCG CCAGCACAGC ATTTGGATCC AGAACTGCGT GATCGCATTT 960  
GTGCGGATGC AGTAAAGTTC TGCCGCTCCA TTGGTTACCA GGGCGCGGGA ACCGTGGAAT 1020  
TCTTGGTCGA TGAAGGGG AACCACGTCT TCATCGAAAT GAACCCACGT ATCCAGGTTG 1080  
AGCACACCGT GACTGAAGAA GTCACCGAGG TGGACCTGGT GAAGGCGCAG ATGCGCTTGG 1140  
CTGCTGGTGC AACCTGAAG GAATTGGGTC TGACCCAAGA TAAGATCAAG ACCCACGGTG 1200  
CAGCACTGCA GTGCCGCATC ACCACGGAAG ATCCAAACAA CGGCTTCCGC CCAGATACCG 1260  
GAACTATCAC CGCGTACCGC TCACCAGGCG GAGCTGGCGT TCGTCTTGAC GGTGCAGCTC 1320  
AGCTCGGTGG CGAAATCACC GCACACTTTG ACTCCATGCT GGTGAAAATG ACCTGCCGTG 1380  
GTTCCGACTT TGAAACTGCT GTTGCTCGTG CACAGCGCGC GTTGGCTGAG TTCACCGTGT 1440  
CTGGTGTGTC AACCAACATT GGTTCCTTGC GTGCGTTGCT GCGGGAAGAG GACTTCACTT 1500  
CCAAGCGCAT CGCCACCGGA TTCATTGCCG ATCACC CGCA CCTCCTTCAG GCTCCACCTG 1560  
CTGATGATGA GCAGGGACGC ATCCTGGATT ACTTGGCAGA TGTCACCGTG AACAAGCCTC 1620  
ATGGTGTGCG TCCAAAGGAT GTTGCAGCTC CTATCGATAA GCTGCCTAAC ATCAAGGATC 1680  
TGCCACTGCC ACGCGGTTCC CGTGACCGCC TGAAGCAGCT TGGCCCAGCC GCGTTTGCTC 1740  
GTGATCTCCG TGAGCAGGAC GCACTGGCAG TTAGTGATAC CACCTTCCGC GATGCACACC 1800  
AGTCTTTGCT TGCGACCCGA GTCCGCTCAT TCGCACTGAA GCCTGCGGCA GAGGCCGTCG 1860  
CAAAGCTGAC TCCTGAGCTT TTGTCCGTGG AGGCCTGGGG CGGCGCGACC TACGATGTGG 1920  
CGATGCGTTT CCTCTTTGAG GATCCGTGGG ACAGGCTCGA CGAGCTGCGC GAGGCGATGC 1980  
CGAATGTAAA CATTGAGATG CTGCTTCGCG GCCGCAACAC CGTGGGATAC ACCCCGTACC 2040  
CAGACTCCGT CTGCCGCGCG TTTGTTAAGG AAGCTGCCAG CTCCGGCGTG GACATCTTCC 2100

GCATCTTCGA CGCGCTTAAC GACGTCTCCC AGATGCGTCC AGCAATCGAC GCAGTCCTGG 2160  
AGACCAACAC CGCGGTAGCC GAGGTGGCTA TGGCTTATTC TGGTGATCTC TCTGATCCAA 2220  
ATGAAAAGCT CTACACCCTG GATTACTACC TAAAGATGGC AGAGGAGATC GTCAAGTCTG 2280  
GCGCTCACAT CTTGGCCATT AAGGATATGG CTGGTCTGCT TCGCCCAGCT GCGGTAACCA 2340  
AGCTGGTCAC CGCACTGCGC CGTGAATTCG ATCTGCCAGT GCACGTGCAC ACCCAGACA 2400  
CTGCGGGTGG CCAGCTGGCA ACCTACTTTG CTGCAGCTCA AGCTGGTGCA GATGCTGTTG 2460  
ACGGTGCTTC CGCACCCTG TCTGGCACCA CCTCCCAGCC ATCCCTGTCT GCCATTGTTG 2520  
CTGCATTGCG GCACACCCGT CGCGATACCG GTTTGAGCCT CGAGGCTGTT TCTGACCTCG 2580  
AGCCGTACTG GGAAGCAGTG CGCGGACTGT ACCTGCCATT TGAGTCTGGA ACCCCAGGCC 2640  
CAACCGGTCG CGTCTACCGC CACGAAATCC CAGGCGGACA GTTGTCCAAC CTGCGTGCAC 2700  
AGGCCACCGC ACTGGGCCCTT GCGGATCGTT TCGAACTCAT CGAAGACAAC TACGCAGCCG 2760  
TTAATGAGAT GCTGGGACGC CCAACCAAGG TCACCCCATC CTCCAAGGTT GTTGGCGACC 2820  
TCGCACTCCA CCTCGTTGGT GCGGGTGTGG ATCCAGCAGA CTTTGCTGCC GATCCACAAA 2880  
AGTACGACAT CCCAGACTCT GTCATCGCGT TCCTGCGCGG CGAGCTTGGT AACCCCTCCAG 2940  
GTGGCTGGCC AGAGCCACTG CGCACCCGCG CACTGGAAGG CCGCTCCGAA GGCAAGGCAC 3000  
CTCTGACGGA AGTTCCTGAG GAAGAGCAGG CGCACCTCGA CGCTGATGAT TCCAAGGAAC 3060  
GTCGCAATAG CCTCAACCGC CTGCTGTTCC CGAAGCCAAC CGAAGAGTTC CTCGAGCACC 3120  
GTCGCCGCTT CGGCAACACC TCTGCGCTGG ATGATCGTGA ATTCTTCTAC GGCCTGGTCG 3180  
AAGGCCGCGA GACTTTGATC CGCCTGCCAG ATGTGCGCAC CCCACTGCTT GTTCGCCTGG 3240  
ATGCGATCTC TGAGCCAGAC GATAAGGGTA TGCGCAATGT TGTGGCCAAC GTCAACGGCC 3300  
AGATCCGCCC AATGCGTGTG CGTGACCGCT CCGTTGAGTC TGTCACCGCA ACCGCAGAAA 3360  
AGGCAGATTC CTCCAACAAG GGCCATGTTG CTGCACCATT CGCTGGTGTT GTCACCGTGA 3420  
CTGTTGCTGA AGGTGATGAG GTCAAGGCTG GAGATGCACT CGCAATCATC GAGGCTATGA 3480  
AGATGGAAGC AACAACTACT GCTTCTGTTG ACGGCAAAAT CGATCGCGTT GTGGTTCCTG 3540  
CTGCAACGAA GGTGGAAGGT GGCGACTTGA TCGTCGTCGT TTCCTAAACC TTTCTGTAAA 3600  
AAGCCCCGCG TCTTCCTCAT GGAGGAGGCG GGGCTTTTTG GGCCAAGATG GGAGATGGGT 3660  
GAGTTGGATT TGGTCTGATT CGACACTTTT AAGGGCAGAG ATTTGAAGAT GGAGACCAAG 3720

GCTCAAAG

3728

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1140 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu  
1 5 10 15

Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu  
20 25 30

Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly  
35 40 45

Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu  
50 55 60

Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala  
65 70 75 80

Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu  
85 90 95

Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr  
100 105 110

Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser  
115 120 125

Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu  
130 135 140

Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly  
145 150 155 160

Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Arg  
165 170 175

Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr  
180 185 190

Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr

195	200	205
Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu 210	215	220
Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser 225	230	235 240
Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His 245	250	255
Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe 260	265	270
Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val 275	280	285
Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln 290	295	300
Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys 305	310	315 320
Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu 325	330	335
Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile 340	345	350
Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile 355	360	365
Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala 370	375	380
Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val 385	390	395 400
Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala 405	410	415
Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile 420	425	430
Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg 435	440	445
Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro 450	455	460
Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val 465	470	475 480
Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro		

485	490	495
Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser 500 505 510		
Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu 515 520 525		
Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala 530 535 540		
His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro 545 550 555 560		
Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Lys Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu 565 570 575		
Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu 580 585 590		
Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val 595 600 605		
Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro 610 615 620		
Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser 625 630 635 640		
Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln 645 650 655		
Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala 660 665 670		
Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys 675 680 685		
Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys 690 695 700		
Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg 705 710 715 720		
Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp 725 730 735		
Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala 740 745 750		
Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala 755 760 765		
Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile		

770	775	780
Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu 785	790	795 800
Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr 805	810	815
Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg 820	825	830
His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr 835	840	845
Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala 850	855	860
Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser 865	870	875 880
Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp 885	890	895
Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser 900	905	910
Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp 915	920	925
Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys 930	935	940
Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala 945	950	955 960
Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro 965	970	975
Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr 980	985	990
Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg 995	1000	1005
Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val Arg 1010	1015	1020
Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn Val Val 1025	1030	1035 1040
Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg Asp Arg Ser 1045	1050	1055
Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp Ser Ser Asn Lys		

1060	1065	1070
Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val Thr Val Thr Val Ala 1075	1080	1085
Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala Val Ala Ile Ile Glu Ala 1090	1095	1100
Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp 1105	1110	1115 1120
Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile 1125	1130	1135
Val Val Val Ser 1140		



**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

**INTERNATIONALES ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  <b>C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)</b></p>	<p><b>A3</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/18228</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. April 1999 (15.04.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/06210</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1998 (30.09.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:  197 43 894.6 4. Oktober 1997 (04.10.97) DE  198 31 609.7 14. Juli 1998 (14.07.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE];  Postfach 1913, D-52425 Jülich (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und  (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIKMANN, Bernd [DE/DE]; Gleißelstetten 49, D-89081 Ulm (DE). PETERS-WENDISCH, Petra [DE/DE]; Steinenkamp 1, D-51496 Bergisch-Gladbach (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PIELKEN, Petra; Becker-Gundahl-Strasse 36, D-81479 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, HU, ID, JP, KR, MX, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b>  Mit internationalem Recherchenbericht.</p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 20. Mai 1999 (20.05.99)</p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR MICROBIAL PRODUCTION OF AMINO ACIDS OF THE ASPARTATE AND/OR GLUTAMATE FAMILY AND AGENTS WHICH CAN BE USED IN SAID METHOD</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄUREN DER ASPARTAT- UND/ODER GLUTAMATFAMILIE UND IM VERFAHREN EINSETZBARE MITTEL</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for microbial production of amino acids of the aspartate and/or glutamate family in which the pyruvate-carboxylase activity is increased by genetically changing the enzyme and/or the pyruvate-carboxylase gene expression of a microorganism which produces the corresponding amino acid. In addition, the invention relates to a pyruvate-carboxylase gene and additional agents which can be used in the inventive method.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren der Aspartat- und/oder Glutamatfamilie, bei dem die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität durch genetische Veränderung des Enzyms und/oder die Pyruvat-Carboxylase-Genexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung ein Pyruvat-Carboxylase-Gen sowie weitere, im erfindungsgemäßen Verfahren einsetzbare Mittel.</p>		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup>: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>6</sup>: C12P, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Microbiology, Vol. 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", page 915 - page 927, see the whole article	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DBDJ, Accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: Characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 February 1998, page 20-109, 165-3587	18-25
X	Appl Microbiol Biotechnol; Vol. 47, 1997; S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", page 430 - page 440, see the whole article, in particular page 431, column 2, lines 7-18	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 1999 (17.02.99)

Date of mailing of the international search report

09 March 1999 (09.03.99)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/06210

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Microbiology, Vol. 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate Carboxylase as an Anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamic- um", page 1095 - page 1103, see the abstract and the discussion	1-37
A	Chemical Abstracts, Vol. 126, Nr 12, 24 March 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoen- olpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid produc- tion", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. july 1996, 1-121	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Vol. 62, Nr 2, February 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequen- ces for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Coryne- bacterium glutamicum", page 429 - page 436, see abstract; page 433, column 2, lines 6-32	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 July 1996 (24.07.96), see abstract	1-37
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144	18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

02/02/99

International application No.  
**PCT/EP 98/06210**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96

---

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPC6: C12P 13/20, C12N 15/60 // (C12P 13/20, C12R 1:15) Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPC6: C12P, C12N		
Recherte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
WPI, PAJ, EPODOC, STRAND, BIOSIS, CA, MEDLINE, SCISEARCH		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Microbiology, Band 144, 1998, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", Seite 915 - Seite 927, Siehe den ganzen Artikel --	1-37
P,X	EMBL, Databas Genbank/DBJ, accession no. Y09548, Peters-Wendisch P.G. et al: "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene", & 11 Feb 1998, nt 20-109, 165-3587 --	18-25
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen. <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie.		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
17 Februar 1999		09.03.99
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde: Europäisches Patentamt, P.B. 5819 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  HAMPUS RYSTEDT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	Appl Microbiol Biotechnol, Band 47, 1997, S.M. Park et al, "Elucidation of anaplerotic pathways in Corynebacterium glutamicum via 13C-NMR spectroscopy and GC-MS", Seite 430 - Seite 440, Siehe den ganzen Artikel, besonders Seite 431, Spalte 2, Zeilen 7-18 --	1-37
A	Microbiology, Band 143, 1997, Petra G. Peters-Wendisch et al, "Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in Corynebacterium glutamicum", Seite 1095 - Seite 1103, Siehe die Zusammenfassung und die Diskussion --	1-37
A	Chemical Abstracts, Band 126, Nr 12, 24 März 1997 (24.03.97), (Columbus, Ohio, USA), Peters-Wendisch, Petra, "Anaplerotic reactions in Corynebacterium glutamicum. Studies of the significance of phosphoenolpyruvate (PEP)-carboxylase and pyruvate-carboxylase in the central metabolism and in amino acid production", THE ABSTRACT Nr 154946, Ber. Forschungszent. Juelich 1996, 1-121 --	1-37
A	Applied and Environmental Microbiology, Band 62, Nr 2, Februar 1996, Muriel Coccagn-Bousquet et al, "Growth Rate-Dependent Modulation of Carbon Flux through Central Metabolism and the Kinetic Consequences for Glucose-Limited Chemostat Cultures of Corynebacterium glutamicum", Seite 429 - Seite 436, Siehe die Zusammenfassung; Seite 433, Spalte 2, Zeilen 6-32 --	1-37
A	EP 0723011 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 24 Juli 1996 (24.07.96), Siehe die Zusammenfassung --	1-37

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/06210

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	Databas Pir, accession no. S73055, R. Smith et al: "Mycobacterium tuberculosis cosmid tbc2", EMBL Data Library, September 1994, a.a. 1-1144  -- -----	18



**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**  
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören  
02/02/99

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/06210

Im Recherchenbericht angefurtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0723011 A1	24/07/96	AU 682547 B	09/10/97
		AU 8099194 A	21/03/95
		BR 9407625 A	21/01/97
		PL 313119 A	10/06/96
		SK 20496 A	06/11/96
		CA 2169170 A	02/03/95
		CN 1133615 A	16/10/96
		CZ 9600524 A	12/06/96
		HU 73690 A	30/09/96
		HU 9600240 D	00/00/00
		JP 7111890 A	02/05/95
		WO 9506114 A	02/03/95
		JP 8070860 A	19/03/96